



Verfahren und Verwendung zur Markierung und Identifizierung applizierter Mittel

Patent number: DE19847118
Publication date: 2000-05-04
Inventor: BERTLING WOLF (DE); GAREIS MANFRED (DE);
GROSCHUP MARTIN (DE)
Applicant: NOVEMBER AG NOVUS MEDICATUS BE (DE)
Classification:
- **International:** G01N33/53; C12Q1/00; C12Q1/68
- **European:** G01N33/53
Application number: DE19981047118 19981013
Priority number(s): DE19981047118 19981013

Also published as:

 WO0022433 (A1)
 EP1127276 (A1)

Abstract of **DE19847118**

The invention relates to a method for marking and identifying applied substances such as medicaments, vaccines, conserved blood and the like, comprising the following steps: a) said substance is provided with at least one immunogen that is harmless with respect to the organism b1) the specific antibodies or T cells formed in the organism after the immunogen has been applied or the receptors thereof are detected by means of an enzyme-immunological or immunochemical detection method or b2) the applied immunogen is detected.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 198 47 118 C 2**

⑤ Int. Cl. 7:
G 01 N 33/53

⑳ Aktenzeichen: 198 47 118.1-52
㉔ Anmeldetag: 13. 10. 1998
㉕ Offenlegungstag: 4. 5. 2000
㉖ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 7. 9. 2000

DE 198 47 118 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ **Patentinhaber:**
november Aktiengesellschaft, Gesellschaft für
Molekulare Medizin, 91056 Erlangen, DE

⑦④ **Vertreter:**
Gaßner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen

⑦② **Erfinder:**
Bertling, Wolf, 91056 Erlangen, DE; Gareis,
Manfred, 95349 Thurnau, DE; Groschup, Martin,
72072 Tübingen, DE

⑥⑧ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:**

US	54 29 952 A
US	51 39 812 A
WO	98 18 003 A2
WO	95 17 737 A1
WO	95 02 702 A1

⑥④ **Verfahren und Verwendung zur Markierung und Identifizierung applizierter Mittel**

⑤⑦ **Verfahren zur Markierung und Identifizierung applizierter Mittel, wie Medikamente, Impfstoffe, Blutkonserven und dgl., mit folgenden Schritten:**
a) Versetzen des Mittels mit mindestens einem für den Organismus unschädlichen Immunogen und
b) Nachweis der infolge einer Applikation des Immunogens im Organismus gebildeten spezifischen Antikörper oder T-Zellen oder deren Rezeptoren mittels eines enzymimmunologischen oder immunochemischen Nachweisverfahrens.

DE 198 47 118 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Verwendung zur Markierung und Identifizierung applizierter Mittel.

Nach dem Stand der Technik wird die Herkunft von Mitteln, wie Medikamente, Impfstoffe, Blutkonserven und dgl., durch einen entsprechenden Aufdruck auf der Verpackung nachgewiesen. Ein solcher Herkunftsnachweis ist nicht fälschungssicher. Verpackungen können leicht nachgeahmt oder mehrfach benutzt werden.

Aus der US 5,139,812 ist ein Verfahren zur inneren Markierung von Stoffen bekannt. Ein solches Verfahren eignet sich grundsätzlich auch zur Markierung von Verpackungen. Die Herstellung einer derart markierten Verpackung ist aber aufwendig. Ein solcher Herkunftsnachweis kann durch mehrfaches Befüllen der markierten Verpackung umgangen werden.

Die WO 98/18003 A2 offenbart ein Verfahren, mit dem die Herkunft eines lebenden Nutztiers sowie davon stammender Produkte zuverlässig nachweisbar ist. Bei diesem Verfahren erfolgt eine biologische Markierung des lebenden Nutztiers durch Applikation mindestens eines für das Nutztier und den Menschen unschädlichen Antigens. Eine Identifikation der durch die Applikation des mindestens einen Antigens gebildeten spezifischen Antikörper wird mittels eines enzymimmunologischen oder immunochemischen Nachweisverfahrens durchgeführt. Dazu können Antikörper aus Blut, Milch oder anderen Körpersekreten oder beim geschlachteten Nutztier auch aus dem Tropf- oder Presssaft des Fleisches nachgewiesen werden.

Aus der US 5 429 952 A ist ein Markierungsverfahren für ein Produkt bekannt, bei dem ein niedermolekulares Hapten als ein Marker mit dem Produkt verbunden wird. Das Hapten ist für das Produkt unschädlich, in bezug auf das Produkt inert und nicht bereits mit dem Produkt verbunden. Das Hapten kann mittels eines immunologischen Tests nachgewiesen werden. Wenn das Hapten in dem Produkt in einem wässrigen Medium enthalten ist, kann der immunologische Test direkt mit einer Probe des Produkts durchgeführt werden. Anderenfalls muß das Hapten in eine wäßrige Lösung gebracht werden. Dazu muß es im allgemeinen aus dem Produkt extrahiert werden.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren und eine Verwendung anzugeben, mit dem die Nachteile nach dem Stand der Technik beseitigt werden. Es sollen insbesondere ein Verfahren und eine Verwendung zur Markierung und Identifizierung applizierter Mittel, wie Medikamente, Impfstoffe, Blutkonserven und dgl., angegeben werden, die einfach anzuwenden, fälschungssicher und für den Organismus unbedenklich sind.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 16 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 15 und 17 bis 30.

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zur Markierung und Identifizierung applizierter Mittel, wie Medikamente, Impfstoffe, Blutkonserven und dgl., mit folgenden Schritten vorgesehen:

- a) Versehen des Mittels mit mindestens einem für den Organismus unschädlichen Immunogen und
- b) Nachweis der infolge einer Applikation des Immunogens im Organismus gebildeten spezifischen Antikörper oder T-Zellen oder Rezeptoren mittels eines enzymimmunologischen oder immunochemischen Nachweisverfahrens.

Das vorgeschlagene Verfahren ermöglicht auf einfache Weise eine Markierung von zur Applikation vorgesehenen

Mitteln. Die Markierung ist für den Organismus unbedenklich. Sie ist einfach identifizierbar.

Nach einem Ausgestaltungsmerkmal wird als Immunogen ein Protein und/oder Peptid verwendet, das üblicherweise weder als zu applizierendes Mittel, noch über die Nahrungskette in den Organismus gelangt und gegen das keine Antikörper vorliegen. Zweckmäßigerweise kann das Protein oder Peptid als Hapten in Kopplung mit einem Carrier verwendet werden. Solche Immunogene sind für den Organismus unbedenklich; sie sind leicht und eindeutig nachweisbar.

Vorteilhafterweise ist das Immunogen derart beschaffen, dass die gebildeten Antikörper oder T-Zellen oder deren Rezeptoren dauerhaft im Organismus verbleiben. So kann auch nach längeren Zeiträumen geprüft werden, ob ein Mittel bestimmter Herkunft appliziert worden ist.

Das Mittel kann mit einer Mischung von mehreren Immunogenen versehen werden. Das ermöglicht eine Codierung der Markierung, so dass eine Vielzahl unterschiedlicher Mittel individuell markiert werden kann.

Selbstverständlich ist es auch denkbar, das Mittel anstelle des Immunogens mit einer dafür codierenden Desoxyribonukleinsäure (DNA) und einer dazu korrespondierenden Regulationssequenz zu versehen.

Zweckmäßigerweise werden als enzymimmunologisches oder immunochemisches Nachweisverfahren ELISA, EIA und/oder RIA verwendet. Dabei können Teststäbchen Verwendung finden. Derartige Nachweisverfahren sind besonders einfach durchführbar.

Zur Verstärkung der Immunantwort kann zusammen mit dem Mittel auch ein Adjuvans appliziert werden. – Die Applikation erfolgt üblicherweise mittels Injektion, Infusion oder im Falle von Impfstoffen z. B. mit Impfpistolen.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist die Verwendung

- a) mindestens eines für den Organismus unschädlichen Immunogens und
- b) eines enzymimmunologischen oder immunochemischen Nachweisverfahrens zum Nachweis der durch die Applikation des Immunogens gebildeten spezifischen Antikörper oder T-Zellen oder deren Rezeptoren zur Markierung und Identifizierung von applizierten Mitteln, wie Medikamenten, Impfstoffen, Blutkonserven und dgl., vorgesehen.

Die Ausgestaltungen der Verwendung entsprechen den vorgenannten Ausgestaltungen des Verfahrens.

Beispiele

Als Proteine, die eine ausgezeichnete spezifische Antikörperbildung stimulieren, können z. B. zusammen mit einer Blutkonserve Immunogene, wie "keyhole limpet hemocyanin", "green fluorescent protein" aus *Aequoria victoria*, inaktive Schlangentoxine sowie Virusproteine, verabreicht werden. Beim vorgenannten Hämocyanin handelt es sich um das Hämocyanin aus der Meeresschnecke "Megathura cremulata". Daneben können auch natürlich vorkommende Peptide oder Polypeptide wie Hirudin, Pheromonotropin oder Ranalexin appliziert werden. Des weiteren können zur Biomarkierung auch synthetisch hergestellte Fragmente von Aminosäureteilsequenzen natürlich vorkommender Immunogene verwendet werden. Schließlich können als Immunogene auch artifizelle Proteine und Peptide dienen, deren Aminosäuresequenz keinem bisher bekannten Stoff entspricht, sondern ausschließlich zum Zweck der Biomarkierung zusammenbzw. hergestellt werden.

Zur Markierung kann auch eine DNA appliziert werden, welche eine das Immunogen kodierende Nukleotidfolge aufweist. Die DNA kann Teilsequenzen oder das gesamte Gen von "keyhole limpet hemocyanin" enthalten. Sie kann aber auch so ausgebildet sein, dass sie nur ein kurzes Peptid beschreibt, wobei mehrere Immunogene auf einer einzigen DNA kodiert sein können. Im Fall natürlich vorkommender Gene oder davon abgeleiteter Sequenzen kann sowohl cDNA als auch genomische DNA mit Intronsequenzen appliziert werden. Neben den das Immunogen kodierenden Nukleotiden kann die DNA weitere Sequenzen enthalten, die für die Expression und Prozessierung des Immunogens im Organismus von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich um Promotorsequenzen sowie um Sequenzen, die eine Transkriptionstermination und Polyadenylierung der mRNA sowie ein intrazelluläres "Trafficking" des Immunogens bewirken. Als Expressionsregulatoren eignen sich Promotoren, die eine hohe Transkriptionsrate der DNA gewährleisten, z. B. der "immediate early" Promotor des Cytomegalovirus oder der Promotor eines nutztierspezifischen "house-keeping" Gens wie β -Aktin. Es sind aber auch Promotoren geeignet, welche die Expression des Immunogens gezielt auf vorgegebene Körperzellen beschränken. Durch geeignete "Trafficking"-Signalsequenzen kann das gebildete Polypeptid in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums dirigiert und in zelluläre Verbreitungswege zur Sekretion oder Expression und Präsentation an der Zelloberfläche geleitet werden.

Der Nachweis der durch die genannten Stoffe induzierten Antikörper erfolgt durch gängige Nachweisverfahren, wie ELISA, EIA und RIA, vorzugsweise unter Verwendung von Teststäbchen, die bsp. in eine entnommene Blutprobe getaucht werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Markierung und Identifizierung applizierter Mittel, wie Medikamente, Impfstoffe, Blutkonserven und dgl., mit folgenden Schritten:
 - a) Versehen des Mittels mit mindestens einem für den Organismus unschädlichen Immunogen und
 - b) Nachweis der infolge einer Applikation des Immunogens im Organismus gebildeten spezifischen Antikörper oder T-Zellen oder deren Rezeptoren mittels eines enzymimmunologischen oder immunochemischen Nachweisverfahrens.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei als Immunogen ein Protein und/oder Peptid verwendet wird, das üblicherweise weder als zu applizierendes Mittel, noch über die Nahrungskette in den Organismus gelangt und gegen das keine Antikörper vorliegen.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Protein oder Peptid aus folgender Gruppe ausgewählt ist: "keyhole limpet hemocyanin", "green fluorescent protein" aus *Aequoria victoria*, inaktive Schlangentoxine, Virusproteine, natürlich vorkommende Peptide oder Polypeptide, insbesondere Hirudin, Pheromonotropin oder Ranalexin, synthetisch hergestellte Fragmente von Aminosäureteilsequenzen natürlich vorkommender Immunogene sowie artifizielle Proteine und Peptide, deren Aminosäuresequenz keinem bisher bekannten Stoff entspricht.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei das Protein oder Peptid als Hapten in Kopplung mit einem Carrier verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Immunogen derart beschaffen ist, dass die gebildeten Antikörper oder T-Zellen oder deren Re-

zeptoren dauerhaft im Organismus verbleiben.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Mittel mit einer Mischung von mehreren Immunogenen versehen wird.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Mittel anstelle des Immunogens mit einer dafür kodierenden Desoxyribonukleinsäure (DNA) und einer dazu korrespondierenden Regulationssequenz versehen wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die DNA Teilsequenzen oder das gesamte Gen von "keyhole limpet hemocyanin" enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die DNA so ausgebildet ist, dass sie ein kurzes Peptid beschreibt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei auf der DNA mehrere Immunogene kodiert sind.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 10, wobei als DNA cDNA oder genomische DNA mit Intronsequenzen appliziert wird.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 bis 11, wobei die DNA für die Expression und Prozessierung des Immunogens im Organismus bedeutende Sequenzen enthält.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei als enzymimmunologisches oder immunochemisches Nachweisverfahren ELISA, EIA und/oder RIA verwendet wird/werden.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der enzymimmunologische oder immunochemische Nachweis unter Verwendung von Teststäbchen durchgeführt wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zusammen mit dem Mittel ein Adjuvans appliziert wird.

16. Verwendung

a) mindestens eines für den Organismus unschädlichen Immunogens und

b1) eines enzymimmunologischen oder immunochemischen Nachweisverfahrens zum Nachweis der durch die Applikation des Immunogens gebildeten spezifischen Antikörper oder T-Zellen oder deren Rezeptoren oder

b2) eines Verfahrens zum Nachweis des Immunogens zur Markierung und Identifizierung von applizierten Mitteln, wie Medikamenten, Impfstoffen, Blutkonserven und dgl.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei das Immunogen ein Protein und/oder Peptid ist, das üblicherweise weder als Impfstoff noch als Arzneimittel, noch über die Nahrungskette in den Organismus gelangt und gegen das natürlicherweise vor der Applikation keine Antikörper vorliegen.

18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei das Protein oder Peptid aus folgender Gruppe ausgewählt ist: "keyhole limpet hemocyanin", "green fluorescent protein" aus *Aequoria victoria*, inaktive Schlangentoxine, Virusproteine, natürlich vorkommende Peptide oder Polypeptide, insbesondere Hirudin, Pheromonotropin oder Ranalexin, synthetisch hergestellte Fragmente von Aminosäureteilsequenzen natürlich vorkommender Immunogene sowie artifizielle Proteine und Peptide, deren Aminosäuresequenz keinem bisher bekannten Stoff entspricht.

19. Verwendung nach Anspruch 17 oder 18, wobei das Protein oder das Peptid als Hapten an einen Carrier gekoppelt ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei das Immunogen derart beschaffen ist, dass die

gebildeten Antikörper oder T-Zellen oder deren Rezeptoren dauerhaft im Organismus verbleiben und mittels enzymimmunologischer oder immunochemischer Nachweisverfahren nachweisbar sind.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei zur Markierung eine Mischung mehrerer verschiedener Immunogene verwendet wird. 5

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 21, wobei anstelle des Immunogens eine dafür kodierende Desoxyribonukleinsäure (DNA) und eine dazu korrespondierende Regulationssequenz verwendet wird. 10

23. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die DNA Teilsequenzen oder das gesamte Gen von "keyhole limpet hemocyanin" enthält.

24. Verwendung nach Anspruch 22, wobei die DNA so ausgebildet ist, dass sie ein kurzes Peptid beschreibt. 15

25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei auf der DNA mehrere Immunogene kodiert sind.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 22 bis 25, wobei als DNA cDNA oder genomische DNA mit Intronsequenzen appliziert wird. 20

27. Verwendung nach einem der Ansprüche 22 bis 26, wobei die DNA für die Expression und Prozessierung des Immunogens im Organismus bedeutende Sequenzen enthält. 25

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 27, wobei als enzymimmunologisches oder immunochemisches Nachweisverfahren ELISA, EIA und/oder RIA verwendet wird/werden.

29. Verwendung nach Anspruch 28, wobei zum enzymimmunologischen oder immunochemischen Nachweis Teststäbchen verwendet werden. 30

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 16 bis 29, wobei ein Adjuvans verabreicht wird. 35

40

45

50

55

60

65